

09/084155

1601

PCT

RECEIVED

NOV 8 1999

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

TECH CENTER 1600/2900

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 5402P132W0	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 97/ 05454	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 04/10/1997	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 22/10/1996
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN ... ET AL.		

1. Der internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.



2. Dieser **BERICHT** umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☐ Außerdem liegen dem Bericht **ANLAGEN** bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT)

Diese Anlagen umfassen insgesamt _____ Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben und die entsprechenden Seiten zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 27/04/1998	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 22. 01. 99
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Niederlande Tel.: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Molina Galan E.  Tel. 340 35 60

11/11/11

11/11/11

11/11/11

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.)

☒ der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung

☐ der Beschreibung, Seite
Seite
Seite
in der ursprünglich eingereichten Fassung
. eingereicht mit dem Antrag
. eingereicht mit Schreiben vom

☐ der Ansprüche, Nr.
Nr.
Nr.
Nr.
in der ursprünglich eingereichten Fassung
in der nach Artikel 19 geänderten Fassung
. eingereicht mit dem Antrag
. eingereicht mit Schreiben vom

☐ der Zeichnungen, Blatt / Abb.
Blatt / Abb.
Blatt / Abb.
in der ursprünglich eingereichten Fassung
. eingereicht mit dem Antrag
. eingereicht mit Schreiben vom

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

☐ Beschreibung: Seite
☐ Ansprüche: Nr.
☐ Zeichnungen: Blatt / Abb.

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den im Zusatzfeld angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2 c)).

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35 (2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit	Ansprüche	1-20	JA
	Ansprüche		NEIN
Erfinderische Tätigkeit	Ansprüche	5, 6 und 9-19	JA
	Ansprüche	1-4, 7, 8 und 20	NEIN
Gewerbliche Anwendbarkeit	Ansprüche	1-20	JA
	Ansprüche		NEIN

2. Unterlagen und Erklärungen

2.1 STAND DER TECHNIK (Regel 64.1 - 64.3 PCT)

- D1: Biochem. Soc. Transact., vol. 18, 1990, 122-131, Vanden Bossche et al.
 D2: US-A-5 426 026, Jordan
 D3: Nuc. Ac. Res., vol. 17, 1989, 804, Lai and Kirsch
 D4: Surgery, vol. 108, 1990, 338-347, Buchman et al.
 D5: WO-A-92/03455, Isis Pharmaceuticals

2.2 NEUHEIT (Artikel 33(2) PCT)

- 2.2.1 Die vorliegende Anmeldung erfüllt das in Artikel 33(2) PCT genannte Kriterium, weil der Gegenstand der Ansprüche 1-20 im Hinblick auf den in der Ausführungsordnung umschriebenen Stand der Technik (Regel 64.1 - 64.3 PCT) nicht vorkommt.

2.3 ERFINDERISCHE TÄTIGKEIT (Artikel 33(3) PCT)

- 2.3.1 Dokument D1, das als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird, offenbart, daß eine Mutation in P45014DM (14- α -Lanosterol-Demethylase-Gen) aus *S. cerevisiae* mit Azolderivat Resistenz zusammenhängt (vgl. Seite 57; "Resistance to azole antifungals"). Der Gegenstand des Anspruchs 1 unterscheidet sich von D1 dadurch, daß Azolderivat resistente-Pilzzellen nachgewiesen werden.

- 2.3.2 Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden, daß ein Verfahren zum Nachweis von Azolderivat resistente Pilzellen bereitgestellt wird. Die Lösung ist der Einsatz von Sonden die Resistenz-verantwortliche Mutationen nachweisen können.
- 2.3.3 Die in Anspruch 1 der vorliegenden Anmeldung vorgeschlagene Lösung kann aus folgenden Gründen nicht als erfinderisch betrachtet werden (Artikel 33(3) PCT):
- 2.3.3.1 Der allgemeine Einsatz von Sonden für den Nachweis von Mutationen, mit eventuell zusätzlicher (PCR) Amplifizierung, ist dem Fachmann bekannt. D2 zum Beispiel beschreibt den Einsatz von Gattungsspezifischen Sonden, die innerhalb eines mit unspezifischen primern amplifiziertes Nukleinsäure-Fragmentes hybridisieren. Somit wird die Gattung verschiedener Candida Proben festgestellt. Die Unterschiede in den Sequenzen zwischen den Gattungen können als "Mutationen" angesehen werden.
- 2.3.3.2 Die Behauptung auf Seite 6 der Anmeldung, daß Mutationen in dem 14- α -Lanosterol-Demethylase-Gen überraschenderweise mit Azolderivat-Resistenz korrelieren, kann in Hinsicht von D1 nicht akzeptiert werden, weil dieser Zusammenhang bekannt war. Der Einsatz von Sonden und/oder Primer für den Nachweis von den Mutationen kann ebensowenig als erfinderisch betrachtet werden.
- 2.3.4 Die abhängigen Ansprüche scheinen keine zusätzlichen Merkmale zu enthalten, die in Kombination mit den Merkmalen irgendeines Anspruchs, auf den die Ansprüche rückbezogen sind, zu einem auf erfinderischer Tätigkeit beruhenden Gegenstand führen könnten. Die Gründe dafür sind die folgenden:
- 2.3.4.1 Auch wenn in D1 die genannte Mutation nur für *S. cerevisiae* beschrieben wurde, liegt es für den Fachmann nahe den Grund für eine Azol Resistenz in *C. albicans* in den entsprechenden mutierten ERG16 Gen zu suchen.
- 2.3.4.2 Digoxigenin Markierung und Wasch-Schritt als in Anspruch 8 beschrieben, stehen dem Fachmann routinemäßig zur Verfügung und tragen nicht zur erfinderischen Tätigkeit bei.
- 2.3.5 Die vorliegende Anmeldung erfüllt das in Artikel 33(3) PCT genannte Kriterium nicht, weil der Gegenstand der Ansprüche 1-4, 7, 8 and 20 nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit beruht (Regel 65.1, 65.2 PCT).

- 2.3.6 Die konkreten Sonden und die dazugehörigen Primer (Sequenzen 1-8) können, in der Meinung der Internationalen vorläufigen Prüfungsbehörde, als neu und erfinderisch betrachtet werden. Die gesamte Sequenz des *C. albicans* ERG16 Gen ist aus D3 bekannt und in D4 (vgl. Seite 339; "Methods") und D5 (vgl. Seite 10, erster Absatz und Sequenz 11) wurden sogar Primer oder Sonden für den Nachweis von *C. albicans* davon abgeleitet. Die Bereitstellung von Sonden die den spezifischen Nachweis von, bis zu diesem Zeitpunkt unerkannte, Azol-Resistenz Mutationen ermöglichen, scheint allerdings nicht ein routinemäßiges Verfahren zu sein.

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT, werden in der Beschreibung weder der in den Dokument D1 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch dieses Dokument angegeben.

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

- 1 Aus der Beschreibung auf Seite 6 geht hervor, daß die Korrelation zwischen Mutationen in den ERG16 Gen und die Azolderivat Resistenz für die Definition der Erfindung wesentlich ist. Da die unabhängige Ansprüche 1, 7, 8 und 20 dieses Merkmal nicht enthalten, entsprechen sie nicht dem Erfordernis des Artikels 6 PCT in Verbindung mit Regel 6.3 b) PCT, daß jeder unabhängige Anspruch alle technischen Merkmale enthalten muß, die für die Definition der Erfindung wesentlich sind.
- 2 Die Ansprüche 1-4, 7, 8 und 20 entsprechen nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT, weil der Gegenstand des Schutzbegehrens nicht klar definiert ist. In den Ansprüchen wird versucht, den Gegenstand durch das zu erreichende Ergebnis zu definieren; damit wird aber lediglich die zu lösende Aufgabe angegeben. Geeignete technische Merkmale wären die Sequenzen von den zu verwendeten Sonden und Primer.

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 5402P132W0	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 97/ 05454	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 04/10/1997
(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 22/10/1996	
Anmelder EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN ... ET AL.	

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nichtrecherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. ☒ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
 - ☒ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
 - ☐ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde.
 - ☐ dem jedoch keine Erklärung beigelegt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
 - ☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:

Abb. Nr. _____	<input type="checkbox"/> wie vom Anmelder vorgeschlagen	<input checked="" type="checkbox"/> keine der Abb.
	<input type="checkbox"/> weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.	
	<input type="checkbox"/> weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	VANDEN BOSSCHE ET AL.: "Mutation in cytochrome P-450 dependent 14 alpha demethylase results in decreased affinity for azole antifungals" BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, Bd. 18, 1990, Seiten 122-131, XP002055089 siehe das ganze Dokument ---	1-4, 7, 8, 20
X	T. M. BROWN: "Molecular genetics and evolution of pesticide resistance" 1996, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US XP002055091 siehe Seite 62 - Seite 71 --- -/--	1-4, 7, 8, 20

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung miteinander oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. Februar 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24/02/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Molina Galan, E

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BUCHMAN ET AL.: "Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplification" SURGERY, Bd. 108, 1990, Seiten 338-347, XP002054012 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,20
A	LAI ET AL.: "Nucleotide sequence of P450 L1A1 from C. albicans" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 17, Nr. 2, 1989, OXFORD GB, Seite 804 XP002054013 siehe das ganze Dokument ---	5,6,9-19
A	WO 92 03455 A (ISIS PHARMACEUTICS INC) 5.März 1992 Seq. Id. 11 siehe Seite 10 ---	1-3,7,8, 20
A	NIESTERS H G M ET AL: "RAPID POLYMERASE CHAIN REACTION-BASED IDENTIFICATION ASSAYS FOR CANDIDA SPECIES" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Bd. 31, Nr. 4, April 1993, Seiten 904-910, XP000673321 in der Anmeldung erwähnt ---	
A	US 5 426 026 A (JORDAN JEANNE A) 20.Juni 1995 ---	
P,X	T. WHITE: "The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole resistant lanosterol 14 alpha demethylase in C. albicans" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Bd. 41, Nr. 7, Juli 1997, Seiten 1488-1494, XP002055090 siehe das ganze Dokument -----	1-8,11, 12,15, 18-20



Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9203455 A	05-03-92	AU 649734 B	02-06-94
		AU 8635591 A	17-03-92
		CA 2089665 A	17-02-92
		EP 0652888 A	17-05-95
		JP 7079704 B	30-08-95
		JP 6501844 T	03-03-94
		US 5691461 A	25-11-97

US 5426026 A	20-06-95	NONE	



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
DOCUMENT TRANSMITTED

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)
26 April 1999 (26.04.99)International application No.
PCT/EP97/05454International filing date (day/month/year)
04 October 1997 (04.10.97)

Applicant

EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN UNIVERSITÄTSKLINIKUM et al

The International Bureau transmits herewith the following documents and number thereof:

 copy of the English translation of the international preliminary examination report (Article 36(3)(a))The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Nestor Santesso

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 5402P132WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP97/05454	International filing date (day/month/year) 04 October 1997 (04.10.1997)	Priority date (day/month/year) 22 October 1996 (22.10.1996)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68		
Applicant EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN UNIVERSITÄTSKLINIKUM		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet. <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 27 April 1998 (27.04.1998)	Date of completion of this report 22 January 1999 (22.01.1999)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer Telephone No. 49-89-2399-0

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☒ the international application as originally filed.
- ☐ the description, pages _____, as originally filed.
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the claims, Nos. _____, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. _____, filed with the letter of _____,
Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1 - 20	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	5, 6 and 9 - 19	YES
	Claims	1 - 4, 7, 8 and 20	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 20	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations**2.1 PRIOR ART (PCT Rule 64.1 to 64.3)**

D1: Biochem. Soc. Transact.; Vol. 18, 1990, 122-131,
Vanden Bossche et al.

D2: US-A-5 426 026, Jordan

D3: Nuc. Ac. Res., Vol. 17, 1989, 804, Lai and Kirsch

D4: Surgery, Vol. 108, 1990, 338-347, Buchman et al.

D5: WO-A-92/03455, Isis Pharmaceuticals

2.2 NOVELTY (PCT Article 33(2))

2.2.1 The present application satisfies the requirement of PCT Article 33(2) since the subjects of Claims 1 to 20 are not suggested in the light of the prior art as defined in the Regulations (PCT Rule 64.1 to 64.3).

2.3 INVENTIVE STEP (PCT Article 33(3))

2.3.1 D1, which is considered the closest prior art, discloses that a mutation in P45014DM (14- α -lanosterol-demethylase gene) from *S. cerevisiae* is associated with azole derivative resistance (cf.

page 57: "Resistance to azole antifungals"). The subject matter of Claim 1 differs from D1 in that azole-derivative-resistant fungal cells are detected.

2.3.2 The problem addressed by the present invention can thus be considered the devising of a method of detecting azole-derivative-resistant fungal cells. The solution is to use probes which can detect mutations that are responsible for resistance.

2.3.3 The solution proposed in Claim 1 of the present application cannot be considered inventive for the following reasons (PCT Article 33(3)):

2.3.3.1 A person skilled in the art is familiar with the general use of probes for detecting mutations, with possible additional (PCR) amplification. D2, for example, describes the use of species-specific probes which hybridise within a nucleic acid fragment amplified by unspecific primers. Therefore the species of different *Candida* probes is established. The differences in the sequences between the species can be regarded as "mutations".

2.3.3.2 The assertion on page 6 of the application that mutations in the 14- α -lanosterol-demethylase gene unexpectedly correlate with azole derivative resistance is unacceptable in the light of D1 since this connection was already known. The use of probes and/or primers for detecting mutations can be considered equally non-inventive.

2.3.4 The dependent claims do not appear to contain any additional features which, combined with the features of any claim to which the dependent claims refer back, might lead to subject matter involving an inventive step. The reasons for this are as follows:

2.3.4.1 Even though the mutation mentioned in D1 was described only for *S. cerevisiae*, it is obvious to a person skilled in the art to seek the reason for azole resistance in *C. albicans* in the corresponding mutated ERG16 gene.

2.3.4.2 Digoxigenin marking and the washing step as described in Claim 8 are routinely available to a person skilled in the art and do not contribute to an inventive step.

2.3.5 The present application does not satisfy the requirement of PCT Article 33(3) since the subjects of Claims 1 to 4, 7, 8 and 20 do not involve an inventive step (PCT Rule 65.1, 65.2).

2.3.6 The specific probes and associated primers (sequences 1 to 8) can, in the opinion of the International Preliminary Examination Authority, be considered novel and inventive. The entire sequence of the *C. albicans* ERG16 gene is known from D3 and in D4 (cf. page 339, "Methods") and D5 (cf. page 10, paragraph 1, and sequence 11) primers or probes for detecting *C. albicans* were even derived therefrom; however, the preparation of probes specifically enabling hitherto unidentified azole-resistance mutations to be detected does not appear to be a routine method.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 97/05454

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii), the description did not cite D1 and it did not briefly outline the relevant prior art contained therein.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. Page 6 of the description indicates that the correlation between mutations in the ERG16 gene and the azole derivative resistance is essential for the definition of the invention. Since independent Claims 1, 7, 8 and 20 do not contain this feature, they do not satisfy the requirement of PCT Article 6 in conjunction with PCT Rule 6.3(b), that every independent claim shall contain all the technical features which are essential for the definition of the invention.
2. Claims 1 to 4, 7, 8 and 20 do not satisfy the requirements of PCT Article 6 since the subject matter for which protection is sought is not clearly defined. The claims attempt to define the subject matter by the effect to be achieved, but in this way they indicate only the problem to be solved. Suitable technical features would be the sequences of the probes and primers to be used.



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/17825</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. April 1998 (30.04.98)</p>		
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/05454</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 4. Oktober 1997 (04.10.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 43 486.6 22. Oktober 1996 (22.10.96) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN UNIVERSITÄTSKLINIKUM [DE/DE]; Geissweg 3, D-72076 Tübingen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EINSELE, Hermann [DE/DE]; Käsenbachstrasse 28/3, D-72076 Tübingen (DE). LÖFFLER, Jürgen [DE/DE]; Wallensteinstrasse 30, D-72770 Reutlingen (DE).</p> <p>(74) Anwälte: WITTE, Alexander usw.; Rotebühlstrasse 121, D-70178 Stuttgart (DE).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/05454</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 4. Oktober 1997 (04.10.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 43 486.6 22. Oktober 1996 (22.10.96) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN UNIVERSITÄTSKLINIKUM [DE/DE]; Geissweg 3, D-72076 Tübingen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EINSELE, Hermann [DE/DE]; Käsenbachstrasse 28/3, D-72076 Tübingen (DE). LÖFFLER, Jürgen [DE/DE]; Wallensteinstrasse 30, D-72770 Reutlingen (DE).</p> <p>(74) Anwälte: WITTE, Alexander usw.; Rotebühlstrasse 121, D-70178 Stuttgart (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/05454</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 4. Oktober 1997 (04.10.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 43 486.6 22. Oktober 1996 (22.10.96) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN UNIVERSITÄTSKLINIKUM [DE/DE]; Geissweg 3, D-72076 Tübingen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EINSELE, Hermann [DE/DE]; Käsenbachstrasse 28/3, D-72076 Tübingen (DE). LÖFFLER, Jürgen [DE/DE]; Wallensteinstrasse 30, D-72770 Reutlingen (DE).</p> <p>(74) Anwälte: WITTE, Alexander usw.; Rotebühlstrasse 121, D-70178 Stuttgart (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>			
<p>(54) Title: METHOD FOR DETECTING RESISTANT FUNGI CELLS IN CLINICAL MATERIAL</p> <p>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON RESISTENTEN PILZZELLEN IN KLINISCHEM MATERIAL</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a method for detecting resistant fungi cells in clinical material. According to said method, fungi-specific nucleic acids are initially extracted from the clinical material and subsequently hybridized with fungi-specific hybridization probes which are targeted against nucleic acid segments of azole derivative-resistant fungi cells.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>In einem Verfahren zum Nachweis von resistenten Pilzzellen in klinischem Material werden zunächst Pilz-spezifische Nukleinsäuren aus klinischem Material extrahiert und danach mit Pilz-spezifischen Hybridisierungs sonden hybridisiert, die gegen Nukleinsäureabschnitte aus Azolderivat-resistenten Pilzzellen gerichtet sind.</p>				

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verfahren zum Nachweis von resistenten Pilzzellen
in klinischem Material

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von resistenten Pilzzellen in klinischem Material.

Das Interesse allgemein an Verfahren zum Nachweis von Pilzzellen ist vor dem Hintergrund zu sehen, daß insbesondere in den letzten Jahren Pilzspezies als nosokomiale Pathogene eine erhebliche Bedeutung bei immunsupprimierten Patienten erlangt haben.

Die bisher bekannten Verfahren zur Analyse von Pilzinfektionen zielen vor allem darauf ab, eine Diagnose der Pilzinfektion und eine Identifizierung der pathogenen Pilzspezies zu ermöglichen. Dazu bedient man sich z.B. einer Anzüchtung von Pilzspezies aus klinischem Material auf geeigneten Nährmedien und ggf. molekularbiologischer Verfahren.

Zu den medizinisch bedeutsamsten fakultativ pathogenen Pilzgattungen zählt die zu den Fungi imperfecti gehörende Gattung *Candida*. Sie ruft die sogenannten *Candida*-Mykosen, auch *Candidosen* genannt, hervor. Der wichtigste Erreger innerhalb der Gattung *Candida* ist dabei die Spezies *Candida albicans*, die neben den meist weniger schwerwiegend verlaufenden Infektionen der Haut und Schleimhäute auch tiefe Organ-Mykosen oder System-Mykosen hervorruft. Unter System-Mykosen versteht man Pilzinfektionen, von denen nicht nur die Haut oder Schleimhäute, sondern auch weitere Organe, Organsysteme oder sogar der ganze Organismus betroffen sind. Im letzteren Fall spricht man auch von "generalisierten" Pilzinfektionen.

Der Erregernachweis bei System-Mykosen ist außerordentlich problematisch und erfolgt in der Praxis häufig erst post mortem. Eine wesentliche Verbesserung haben hier molekularbiologische Analyseverfahren gebracht, mit deren Hilfe es möglich ist, schnell und zuverlässig Pilzinfektionen nachzuweisen und verschiedene Pilzspezies voneinander zu unterscheiden.

In der Veröffentlichung "Rapid, polymerase chain reaction-based identification assays for *Candida* species" von Niesters et al. (1993), *Journal of Clinical Microbiology*, Seiten 904 bis 910, wird ein auf der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) beruhendes Verfahren beschrieben, mit dem verschiedene *Candida*-Spezies nachgewiesen und differenziert werden können.

Bei diesem Verfahren werden die Pilz-spezifischen Nukleinsäuren zunächst aus klinischem Material extrahiert und danach weiter analysiert. Zur Analyse wird der 18ssuRNA-Genbereich näher untersucht. Mit Hilfe geeigneter Primer wird dazu ein Abschnitt dieses Genbereichs in der PCR amplifiziert und die daraus hervorgehenden PCR-Produkte werden entweder sequenziert, mit Hilfe von Restriktionsenzymen analysiert oder mit spezifischen Hybridisierungssonden hybridisiert. Im letzteren Fall werden die Hybridisierungssonden durch Einbau radioaktiver Nukleotide markiert und durch Autoradiographie nachgewiesen. Aufgrund der Sequenzen, der Restriktions- oder Hybridisierungsmuster können dann verschiedene Candida-Spezies voneinander unterschieden werden.

Ein weiteres Verfahren, mit dem Candida albicans-Infektionen diagnostiziert werden können, ist in der Veröffentlichung "Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplification. Part I. Rapid identification of Candida albicans by in vitro amplification of a fungus specific gene" von Buchman et al. (1990), Surgery 108, Seiten 338 bis 347, beschrieben.

Bei diesem Verfahren erfolgt der Nachweis einer Candida albicans-Infektion durch PCR-Amplifikation eines anderen Pilz-spezifischen Genbereiches, nämlich des Gens für das Enzym 14- α -Lanosterol-Demethylase.

Die PCR-Produkte werden hier nicht durch Hybridisierung, sondern durch Auftrennung im Agarose-Gel und Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid nachgewiesen.

In beiden oben beschriebenen Verfahren werden molekularbiologische Techniken dazu eingesetzt, Pilzinfektionen in Patientenmaterial nachzuweisen und, wie in der Publikation von Niesters

beschrieben, zusätzlich verschiedene Spezies der Gattung Candida voneinander zu unterscheiden.

Ist die systemische Pilzinfektion einmal nachgewiesen, so kann sie mit verschiedenen Antimykotika, also das Wachstum von Pilzen hemmenden Mitteln, bekämpft werden. Die zur systemischen Anwendung eingesetzten Wirkstoffe sind dabei Azolderivate, das Polyen Amphotericin B, Flucytosin, Griseofulvin und Terbinafin. Dabei sind die üblicherweise eingesetzten Antimykotika die Azolderivate, zu denen bspw. das Fluconazol gehört.

Durch den häufigen Einsatz dieser Klasse der Antimykotika bilden sich in jüngster Zeit resistente Pilzstämme aus, deren Wachstum mit diesen Therapeutika nicht mehr gehemmt werden kann. Von dem Einsatz dieses Mittels kann jedoch nicht allgemein abgesehen werden, da es neben der guten Wirksamkeit gegen System-Mykosen im Gegensatz zu den anderen Antimykotika nur geringe und darüber hinaus harmlose Nebenwirkungen hervorruft. Das wesentliche Problem dabei ist, daß solche Resistenzen nicht frühzeitig erkannt werden können, da keine schnellen Tests zur Überprüfung des Vorliegens von resistenten Pilzzellen zur Verfügung stehen.

So werden zunächst Azolderivate als "Mittel der Wahl" gegeben, wobei dann nur daraus, daß sich beim Patienten trotz hoher Dosierung und langanhaltender Behandlung keine Besserung einstellt, geschlossen werden kann, daß er mit Azolderivat-resistenten Pilzzellen infiziert ist. Häufig wird diese Diagnose erst dann gestellt, wenn der Infektionsverlauf beim Patienten trotz Behandlung mit den hier jedoch unwirksamen Azolderivaten einen dramatischen Verlauf nimmt.

Vor diesem Hintergrund ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein schnelles und zuverlässiges Verfahren zu schaffen, mit dem gegen Azolderivate resistente Pilzzellen spezifisch nachgewiesen werden können.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren mit den folgenden Schritten gelöst:

- a) Extraktion von Pilz-spezifischen Nukleinsäuren aus klinischem Material; und
- b) Hybridisierung der Pilz-spezifischen Nukleinsäuren mit Hybridisierungssonden, die gegen Nukleinsäureabschnitte aus Azolderivat-resistenten Pilzzellen gerichtet sind.

Durch die Hybridisierung Pilz-spezifischer Nukleinsäuren mit Hybridisierungssonden, die spezifisch Nukleinsäureabschnitte aus Azolderivat-resistenten Pilzzellen, nicht jedoch solche aus Azolderivat-sensitiven Pilzzellen erkennen, wird das Auffinden resistenter Pilzstämme jetzt einem schnellen, reproduzierbaren und einfach durchzuführenden molekularbiologischen Verfahren zugänglich gemacht. Damit kann in kurzer Zeit und ausgehend von geringen Mengen klinischen Materials ein Nachweis erfolgen. Bei positivem Befund, also dem Vorliegen resistenter Pilzstämme, kann dann auf ein anderes Antimykotikum übergegangen werden, mit dem die Pilzinfektion letztlich bekämpft wird.

Zu diesem Verfahren können Pilz-spezifische Nukleinsäuren vorzugsweise aus Blut, jedoch auch aus Biopsiematerial, Sputum, Schleimhautabstrichen oder sonstigem Patientenmaterial extrahiert werden.

Dabei kann entweder die Pilz-spezifische DNA oder RNA isoliert werden, die dann durch DNA/DNA-, DNA/RNA- oder RNA/RNA-Hybridisierung nachgewiesen werden.

Es ist möglich, die Hybridisierung in Lösung oder an festen Trägern, wie beispielsweise Membranen oder Säulen, nachzuweisen, wobei die verwendeten Hybridisierungssonden radioaktiv oder nicht-radioaktiv markiert und dann die spezifische Hybridisierung durch Autoradiographie bzw. Enzym-katalysierte Farbreaktionen detektiert werden.

Somit wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe vollkommen gelöst.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es bevorzugt, wenn die Hybridisierungssonden gegen einen DNA-Abschnitt aus dem 14- α -Lanosterol-Demethylase-Gen gerichtet sind.

Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung konnten nämlich zeigen, daß bei Pilzspezies, die eine Resistenz gegenüber Azolderivaten aufweisen, Mutationen in dieser Genregion der Pilz-DNA auftreten, die überraschenderweise hochsignifikant mit dem klinischen und mikrobiologischen Befund einer Azolderivat-Resistenz korrelieren.

Eine mögliche Erklärung für diese Korrelation geht von der Erkenntnis aus, daß die Azolderivate die Ergosterolsynthese von Pilzen hemmen. Ergosterol ist ein Steroid, das in das sogenannte Plasmalemma, die Phospholipidschicht, die der Zellwand der Pilze innen anhaftet, eingelagert wird. Ergosterol wird in der Zelle aus Lanosterol, einer Vorstufe, synthetisiert. Der entscheidende Schritt bei der Ergosterolsynthese aus Lanosterol wird von dem Enzym 14- α -Lanosterol-Demethylase, kurz 14-DM, katalysiert.

Da das Ergosterol ein essentieller Baustein des Plasmalemmas ist, kann in Abwesenheit von Ergosterol keine Zellteilung mehr stattfinden. Für Zellteilungen ist immer eine Neusynthese von Zellwand und Plasmalemma notwendig.

Weil das Steroid Ergosterol spezifisch bei Pilzen, nicht jedoch bei menschlichen Zellen oder Bakterien auftritt, kann die Inhibition der für das Wachstum der Pilzzellen essentiellen Ergosterol-Synthese erfolgreich zur Bekämpfung von Pilzinfektionen eingesetzt werden.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist somit von Vorteil, daß Hybridisierungs-Sonden gegen das Gen eingesetzt werden, das für das Protein codiert, an dem die Azolderivate direkt angreifen. Bei den resistenten Pilzzellen treten in diesem Gen gehäuft Änderungen der Nukleinsäure-Sequenz auf. Die spezifischen Hybridisierungs-sonden sind dann so ausgelegt, daß sie diese Sequenzänderungen erkennen, also nur an Genabschnitte von Pilzzellen binden, die eine Resistenz gegen Azolderivate aufweisen.

Bei diesem Verfahren ist es weiterhin bevorzugt, wenn die Hybridisierungssonden gegen einen DNA-Abschnitt aus dem 14- α -Lanosterol-Demethylase-Gen der Spezies *Candida albicans* gerichtet sind. Dieses Gen wird bei *Candida albicans* auch ERG16-Gen genannt.

Hierbei ist von Vorteil, daß die Hybridisierungssonden es möglich machen, resistente Stämme der am weitesten verbreiteten pathogenen Pilzspezies, nämlich *Candida albicans*, zu diagnostizieren.

In einer Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird zwischen Schritt a) und b) eine PCR-Reaktion durchgeführt, in der Abschnitte des 14- α -Lanosterol-Demethylase-Gens amplifiziert werden.

Diese Maßnahme hat also den Vorteil, daß das Verfahren sowohl an Sensitivität als auch an Spezifität gewinnt, da große Mengen an Ausgangsmaterial erzeugt werden, in dem spezifisch nur der benötigte Genabschnitt enthalten ist. Das mit PCR amplifizierte Material wird dann z.B. in die Southern-Hybridisierung eingesetzt.

In einer Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es bevorzugt, wenn in der PCR-Reaktion als Primerpaare die Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 1 und SEQ ID-No: 2 oder die Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 3 und SEQ ID-No: 4 eingesetzt werden.

Dabei ist vorteilhaft, daß nach Erkenntnis der Erfinder mit diesen Primerpaaren DNA-Abschnitte amplifiziert werden, in denen für resistente Pilzspezies charakteristische DNA-Sequenzen enthalten sind. Die dabei entstehenden Amplifikationsprodukte sind deutlich kürzer als das ganze Gen und ermöglichen somit eine einfachere Weiterverarbeitung.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es weiterhin bevorzugt, wenn in Schritt b) eine oder mehrere der Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 5 bis 8 des beiliegenden Sequenzprotokolls als Hybridisierungssonden eingesetzt werden.

Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung haben nämlich erkannt, daß mit diesen Hybridisierungssonden überraschenderweise resistente Candida-Spezies, deren Resistenz nur durch jeweils einen einzelnen Basenaustausch im ERG16-Gen zustandegekommen ist, von sensitiven Stämmen, die diese Mutation nicht aufweisen, unterschieden werden können.

In einer vorteilhaften Ausführung werden in Schritt b) die Hybridisierungssonden mit Digoxigenin markiert und in die Southern-Hybridisierung eingesetzt. Der Nachweis einer spezifischen Hybridisierung erfolgt dann durch Enzym-konjugierte Anti-Digoxigenin-Antikörper, wobei die Enzyme Farbreaktionen katalysieren.

Hierbei ist von Vorteil, daß die Markierung der Hybridisierungs-sonden nicht radioaktiv erfolgen muß. Außerdem können große Mengen an Hybridisierungs-sonden gleichzeitig markiert werden, die dann aliquotiert und bei -20°C gelagert werden können, da sie über lange Zeit stabil sind. Für die individuellen Nachweisreaktionen können dann Aliquots aus der gleichen Markierungsreaktion aufgetaut und eingesetzt werden, so daß eine hohe Reproduzierbarkeit über lange Zeiträume hinweg gewährleistet ist.

Selbstverständlich sind jedoch auch radioaktive Markierungsmethoden und weitere nicht-radioaktive Markierungsmethoden, wie bspw. die Markierung mit Biotin möglich.

Bei der Southern-Hybridisierung ist vorteilhaft, daß die zu analysierende Nukleinsäure schnell auf eine Membran, bspw. eine Mikrozellulose- oder Nylonmembran aufgebracht werden kann. Die schnellste Methode ist dabei die dem Fachmann geläufige "Blot-Blot" oder "Dot-Blot"-Methode.

Es ist jedoch auch möglich, die zu analysierende DNA zunächst im Agarose-Gel aufzutrennen und erst dann auf die Membran zu transferieren.

Die Pilz-DNA kann direkt, oder zuvor durch PCR amplifiziert in die Southern-Hybridisierung eingesetzt werden.

Es versteht sich jedoch, daß es auch möglich ist, Pilz-spezifische RNAs zu analysieren. Diese können entweder direkt aus dem Zytoplasma von Pilzzellen isoliert werden, oder erst durch Reverse Transkription hergestellt werden. Die Analyse kann dann durch Northern-Blot oder weitere RNA-Nachweisreaktionen erfolgen.

Die Hybridisierung muß nicht auf Membranen, wie bspw. bei Southern- oder Northern-Hybridisierung, erfolgen, sondern kann auch in Lösung oder an Säulen durchgeführt werden.

Wenn in Schritt b) die Hybridisierungssonden mit den Nukleinsäure-Sequenzen SEQ ID-No: 4 bis 8 eingesetzt werden, ist es bevorzugt, wenn nach dem Hybridisieren ein Waschschrift bei einer Temperatur durchgeführt wird, die um ca. 1°C unter der Schmelztemperatur (T_m) der jeweils eingesetzten Hybridisierungs-sonde liegt.

Hierbei ist von Vorteil, daß in diesem Waschschrift wegen der relativ hohen Temperatur nur solche Doppelstrang-Regionen stabil sind, die keine Fehlpaarung aufweisen. Somit werden alle gepaarten Hybridisierungssonden, deren DNA-Sequenzen nicht völlig mit dem entsprechenden Pilz-DNA-Abschnitt übereinstimmen, in dem Waschschrift gewaschen und geben daher in der Nachweisreaktion kein Signal mehr. Ein Signal wird auf diese Art und Weise nur dann erhalten, wenn die Pilz-DNA aus einer resistenten Pilzzelle stammt, in der die Mutation enthalten ist.

Auf diese Weise ist es also möglich, mit Hilfe der spezifischen Hybridisierungssonden Genabschnitte zu unterscheiden, die nur in einer einzigen Base voneinander abweichen.

Die Erfindung betrifft ferner die Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 1 bis 8 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll.

Dabei ist es bevorzugt, wenn die Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 1 und 2 als Primer für die PCR-Reaktion und die Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 5 und/oder 6 als Hybridisierungs sonden in das Verfahren zur Detektion von Azolderivat-resistenten Pilzzellen eingesetzt werden.

Außerdem ist bevorzugt, wenn die Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 3 und 4 als Primer und die Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 7 oder 8 als Hybridisierungs sonden in das erfindungsgemäße Verfahren eingesetzt werden.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß auf diese Art und Weise zunächst in der PCR ohne Schwierigkeiten amplifizierbare, leicht handhabbare DNA-Fragmente von 300 - 400 Basenpaaren in großen Mengen bereitgestellt werden, und danach die ggf. in diesen PCR-Fragmenten enthaltenen Basenaustausche mit den Hybridisierungs sonden identifiziert werden können.

Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung konnten nämlich zeigen, daß in Azolderivat-resistenten Pilzstämmen eine Reihe von einzelnen Basenaustauschen gegenüber den Azolderivat-sensitiven Pilzstämmen auftreten. So führt ein Basenaustausch von T nach G im ERG16-Gen dazu, daß die Aminosäure Phenylalanin Nr. 105 des Enzyms 14-DM zu einem Leucin mutiert wird. Dieser T/G-Austausch ist auf Genebene mit Hilfe der Hybridisierungs sonde mit der Nukleotidsequenz SEQ ID-No: 5 nachzuweisen. Weiterhin haben die Erfinder erkannt, daß bei resistenten Pilzstämmen ein Basenaustausch von A nach C auftreten kann, wodurch die Aminosäure Glutamin Nr. 142 zu einem Prolin mutiert wird. Diese Mutation ist mit Hilfe der Hybridisierungs sonde mit der Nukleotidsequenz SEQ ID-No: 6 detektierbar. Darüber hinaus wurden zwei weitere Basenaustausche, beide von G nach A, gefunden. Dies führt dazu, daß das Glycin Nr. 464 der 14-DM zu einem Serin

und das Valin Nr. 488 zu einem Isoleucin mutiert wird. Diese beiden Punktmutationen werden mit den Hybridisierungs sonden mit den Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 7 bzw. 8 nachgewiesen.

Da resistente Pilzstämme auf dem spezifisch amplifizierten PCR-Fragment entweder eine oder mehrere der Basenaustausche enthalten, ist es vorteilhaft, wenn die entsprechenden Hybridisierungs sonden gleichzeitig in die Southern-Hybridisierung eingesetzt werden. Bei einem positiven Signal liegt dann in jedem Fall eine resistente Pilzspezies vor. Wird nur mit einer der Hybridisierungs sonden hybridisiert, so kann man nachweisen, welche Mutation bei diesem resistenten Pilzstamm aufgetreten ist und ob eine oder mehrere Mutationen vorliegen.

Es versteht sich jedoch, daß als Primer auch die Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 1 und SEQ ID-No: 4 kombiniert werden können, so daß dann auf dem amplifizierten PCR-Fragment von ca. 1.400 Basenpaaren alle mit den Hybridisierungs sonden mit den Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 5 bis 8 detektierbaren Mutationen enthalten sind.

Die Erfindung betrifft ferner einen Kit zur Analyse von Pilzinfektionen mit Azolderivat-resistenten Pilzstämmen, wobei in diesem Kit eine oder mehrere der Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 1 bis 8 enthalten sind.

Ein solcher Kit hat den Vorteil, daß das Verfahren besonders schnell und einfach durchzuführen ist, da das durchführende Labor sich die Primer und Hybridisierungs sonden nicht erst selbst herstellen lassen muß.

Außerdem können in dem Kit sämtliche erforderlichen Lösungen zur Durchführung der PCR-Reaktion und der Hybridisierung

enthalten sein. Dadurch wird es möglich, das erfindungsgemäße Verfahren auch in einem Routinelabor von angelernten Kräften durchführen zu lassen. Außerdem kann das Verfahren schnell und ohne langwierige Vorbereitungen mit hoher Reproduzierbarkeit durchgeführt werden, wenn alle benötigten Stoffe für viele Reaktionen in dem Kit bereitgestellt werden.

Weitere Vorteile ergeben sich aus der nachstehenden Beschreibung.

Es versteht sich, daß die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in den jeweils angegebenen Kombinationen, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Beispiele für die Durchführung der einzelnen Verfahrensschritte sind in der folgenden Beschreibung angegeben.

Beispiel 1: Anzucht von Candida albicans-Stämmen

Zur Analyse und zum Vergleich resistenter Candida albicans-Stämme mit sensitiven Candida albicans-Stämmen werden Patienten-Material oder Hefe-Proben für 48 Stunden bei 30°C auf einem zur Hefe-anzucht standardmäßig verwendeten Medium, dem Sabouraud-Glukose-Agar, bebrütet. Danach werden mehrere Kolonien abgeimpft und in steriler 0,9-%iger Natriumchloridlösung aufgenommen.

Beispiel 2: Aufschließen der Pilzzellen und Isolation der Pilz-DNA

Der Aufschluß der Pilzzellen erfolgt durch alkalische Lyse (50 mM NaOH, 10 Minuten, 95°C) und darauf folgende Neutralisation und enzymatische Behandlung mit Zymolyase der Firma Sigma. Die Denaturierung der Proteine wird in Tris/EDTA und 10%-iger SDS-Lösung bei 65°C durchgeführt.

In der nunmehr vorliegenden Lösung befinden sich Trümmer der Pilzzellen sowie freie Pilz-DNA, die nun isoliert werden muß.

Hierzu erfolgt zunächst eine Proteinpräzipitation mit 5 M Kaliumacetat und eine Fällung der DNA durch Zugabe von eiskaltem Isopropanol. Das Fällungsprodukt wird für die weiteren Verfahrensschritte verwendet.

Beispiel 3: Amplifikation eines DNA-Fragmentes aus dem ERG16-Gen

Die PCR-Reaktion dient dazu, zunächst Abschnitte aus dem ERG16-Gen zu amplifizieren, an die die spezifischen Hybridisierungs-sonden binden. So wird das insgesamt 1851 bp lange ERG16-Gen in leicht handhabbare und ohne Schwierigkeiten in der PCR amplifizierbare Abschnitte unterteilt.

Wenn als Hybridisierungssonde die DNA-Sequenz SEQ ID-No: 5 und/oder 6 eingesetzt werden soll, wird eine PCR mit Primern mit den Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 1 (Upstream Primer) und 2 (Downstream Primer) durchgeführt.

Mit den genannten Primern wird dann ein PCR-Produkt erhalten, das den Bereich von Base 379 bis Base 676, also ca. 300 Basen-paare des ERG16-Gens umfaßt.

Wenn als Hybridisierungssonden die DNA-Sequenzen SEQ ID-No: 7 und/oder 8 eingesetzt werden sollen, werden in die PCR Primer mit den Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 3 (Upstream Primer) und 4 (Downstream Primer) eingesetzt.

Mit diesen Primern wird der Bereich von Base 1360 bis Base 1774 des ERG16-Gens, also ein ca. 400 Basenpaar-Fragment, amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen sind dabei die folgenden:

Puffer (50 μ l):
10 mM Tris pH 9,6
50 mM NaCl
10 mM MgCl₂
0,2 mg/ml BSA
Polymerase
je 0,5 mM Nukleotide
je 100 pM Primer
Anfängliche Denaturierung: 3 min bei 94°C
Zyklus-Denaturierung: 0,5 min bei 94°C
Annealing: 1 min bei 62°C
Extension: 2 min bei 72°C
Terminale Extension: 5 min bei 72°C
Zykluszahl: 34

Die hohe Magnesiumkonzentration im Puffer sorgt für eine hohe Spezifität der Polymerase, die mit 72°C im Extensions-Schritt bei ihrem Temperaturoptimum arbeiten kann.

Durch die PCR-Reaktionen wird Ausgangsmaterial in genügend großer Menge erhalten, um nun weiter zu analysieren, ob die DNA aus resistenten oder sensitiven Pilzzellen stammt.

Die Lage der Primer und der Hybridisierungs sonden auf dem ERG16-Gen sind in der am Schluß der Beschreibung aufgeführten Tabelle I enthalten.

Beispiel 4: Southern-Hybridisierung der PCR-Fragmente

Die in Beispiel 3 erhaltenen PCR-Produkte werden hitzedenaturiert und auf Nylonmembranen aufgebracht, bspw. in dem dem Fachmann geläufigen Slot-Blot-Verfahren eingesetzt. Auf der Nylonmembran wird die DNA vernetzt. Die Markierung der Hybridisierungssonden erfolgt durch Einbau Digoxigenin-markierter Nukleotide in Verfahren, die dem Fachmann geläufig sind (bspw. "Nick-translation" oder Random priming).

Die auf der Membran immobilisierte DNA wird dann zunächst für 20 Minuten mit 0,4 N NaOH denaturiert und danach mit 2 x SSPE (1 x SSPE = 150 mM NaCl, 10 mM Natriumdihydrogenphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,7) neutralisiert. Die Prähybridisierung der Membran erfolgt für 20 Minuten in 6 x SSPE, 5 x Denharts-Lösung, 0,1 % N-Lauryl-Sarcosin-Na, 0,02 % SDS bei 42°C.

Die Hybridisierung wird danach in der oben beschriebenen Prähybridisierungslösung durchgeführt, der 30 pM digoxigenierte Hybridisierungssonde zugesetzt wurde, und zwar für 20 Minuten bei 42°C. Als Hybridisierungssonde werden eine oder mehrere der Sequenzen SEQ ID-No: 5 bis 8, einzeln, aufeinanderfolgend oder mehrere zugleich eingesetzt.

Die Spezifität der Hybridisierung wird durch dann erfolgende Waschschrte bestimmt. Die ersten beiden Waschschrte werden für 5 Minuten in 2 x SSPE, 0,1 % SDS bei 42°C durchgeführt. Dann werden zwei Waschschrte jeweils für 7 Minuten in 6 x SSPE, 1 % SDS durchgeführt, wobei die Waschtemperatur in etwa, vorzugsweise genau um 1°C unter dem T_m-Wert liegt.

Die Schmelztemperaturen der Hybridisierungssonden sowie die durch die Hybridisierungssonden detektierbaren Basenaustausche sind in Tabelle I angegeben.

Stimmt die Nukleotidsequenz der Hybridisierungssonde nicht exakt mit der entsprechenden Sequenz des PCR-Fragments überein, so wird die Hybridisierungssonde in diesem Schritt gewaschen.

Anschließend wird die Nachweisreaktion durchgeführt, bei der untersucht wird, ob digoxigenierte Hybridisierungssonde auf der Membran enthalten ist oder nicht. Dies erfolgt in einem Verfahren nach dem Herstellerprotokoll der Firma Boehringer Mannheim mit Hilfe Enzym-konjugierter Anti-Digoxigenin-Antikörper. Das Enzym katalysiert dann eine Reaktion, die zur Erzeugung eines unlöslichen Farbkomplexes führt.

Hat eine der spezifischen Hybridisierungssonden mit den Sequenzen SEQ ID-No: 5 bis 8 spezifisch mit der Pilz-DNA aus klinischem Material hybridisiert, so sind bei dem Patienten Pilzzellen enthalten, die gegen Azolderivate resistent sind. Bei einer Infektion mit solchen Pilzzellen ist eine Therapie mit Azolderivat-Antimykotika also sinnlos und die Therapie zur Bekämpfung der Candida-Infektion muß umgestellt werden.

Tabelle I:

Nukleotidsequenz	Art	Bindungsstelle auf ERG16-Gen (nt)	Länge der Nukleotid- sequenz (nt)	Länge des PCR- Fragmentes (bp)	Tm [°C]	Basen- austausch
SEQ ID-No: 1	Upstream-Primer	379-400	21	297	-	-
2	Downstream-Primer	657-676	19		-	-
3	Upstream-Primer	1360-1383	23	414	-	-
4	Downstream-Primer	1751-1774	23		-	-
5	Hybridisierungs-Sonde	448-747	30	-	74°C	T → G
6	Hybridisierungs-Sonde	557-584	28	-	74°C	A → C
7	Hybridisierungs-Sonde	1522-1551	30	-	82°C	G → A
8	Hybridisierungs-Sonde	1597-1628	32	-	76°C	G → A

SEQUENZPROTOKOLL

ALLGEMEINE ANGABEN:

ANMELDER:
NAME: Eberhard-Karls-Universität Tübingen,
Universitätsklinikum
STRASSE: Geissweg 3
ORT: Tübingen
LAND: Deutschland
POSTLEITZAHL: 72076
TELEFON: 07071-29-1
TELEFAX: 07071-293966

BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Nachweis von resistenten
Pilzzellen

ANZAHL DER SEQUENZEN: 8

COMPUTERLESBARE FASSUNG:
DATENTRÄGER: (folgt)
COMPUTER:
BETRIEBSSYSTEM:
SOFTWARE:

DATEN DER ANMELDUNG:
ANWALTSAKTE: 5402P132

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:1:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
LÄNGE: 21 Basenpaare
ART: Nukleinsäure
STRANGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: linear

HYPOTHETISCH: JA

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:1:

AAGTATGGTG ATGTATTTTC A

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:2:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 19 Basenpaare
ART: Nukleinsäure
STRANGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: linear

HYPOTHETISCH: JA

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:2:

AAACTTTCAT CAGTAACAA

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:3:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 23 Basenpaare
ART: Nukleinsäure
STRANGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: linear

HYPOTHETISCH: JA

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:3:

TCTCCAGGTT ATGCTCATAC TAG

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:4:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 23 Basenpaare
ART: Nukleinsäure
STRANGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: linear

HYPOTHETISCH: JA

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:4:

AACAAATCAGA ACACTGAATC GAA

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:5:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
LÄNGE: 30 Basenpaare
ART: Nukleinsäure
STRANGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: linear

HYPOTHETISCH: JA

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:5:

TCATGAATTT GTTTTGAATG CTAAATTATC

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:6:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
LÄNGE: 28 Basenpaare
ART: Nukleinsäure
STRANGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: linear

HYPOTHETISCH: JA

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:6:

CCAGATTAAT GGAACCAAAA AAATTTGC

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:7:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
LÄNGE: 30 Basenpaare
ART: Nukleinsäure
STRANGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: linear

HYPOTHETISCH: JA

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:7:

CCTTATTTAC CATTAGTGG TGGTAGACAT

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:8:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 32 Basenpaare

ART: Nukleinsäure

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

HYPOTHETISCH: JA

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:8:

TTAACTACTT TTATTTATAA TTAAAGATGG AC

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von resistenten Pilzzellen in klinischem Material, mit den Schritten:
 - a) Extraktion von Pilz-spezifischen Nukleinsäuren aus klinischem Material; und
 - b) Hybridisierung der Pilz-spezifischen Nukleinsäuren mit Hybridisierungssonden, die gegen Nukleinsäure-abschnitte aus Azolderivat-resistenten Pilzzellen gerichtet sind.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierungssonden gegen einen DNA-Abschnitt aus dem 14- α -Lanosterol-Demethylase-Gen gerichtet sind.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierungssonden gegen einen DNA-Abschnitt aus dem 14- α -Lanosterol-Demethylase-Gen (ERG16-Gen) der Spezies *Candida albicans* gerichtet sind.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen Schritt a) und b) eine PCR-Reaktion durchgeführt wird, in der Abschnitte des 14- α -Lanosterol-Demethylase-Gens amplifiziert werden.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß in der PCR-Reaktion als Primerpaare die Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 1 und SEQ ID-No: 2 oder die Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 3 und SEQ ID-No: 4 eingesetzt werden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt b) eine oder mehrere der Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 5 bis 8 des beiliegenden Sequenzprotokolls als Hybridisierungs-sonde eingesetzt werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt b) die Hybridisierungs-sonden mit Digoxigenin markiert werden und in die Southern-Hybridisierung eingesetzt werden.
8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß nach dem Hybridisieren zumindest ein Waschschr-itt bei einer Temperatur durchgeführt wird, die um ca. 1°C unter der Schmelztemperatur (T_m-Wert) der jeweils eingesetzten Hybridisierungs-sonde liegt.
9. Nukleotidsequenz SEQ ID-No: 1 aus dem beiliegenden Sequenz-protokoll.
10. Nukleotidsequenz SEQ ID-No: 2 aus dem beiliegenden Sequenz-protokoll.
11. Nukleotidsequenz SEQ ID-No: 3 aus dem beiliegenden Sequenz-protokoll.
12. Nukleotidsequenz SEQ ID-No: 4 aus dem beiliegenden Sequenz-protokoll.
13. Nukleotidsequenz SEQ ID-No: 5 aus dem beiliegenden Sequenz-protokoll.
14. Nukleotidsequenz SEQ ID-No: 6 aus dem beiliegenden Sequenz-protokoll.

15. Nukleotidsequenz SEQ ID-No: 7 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll.
16. Nukleotidsequenz SEQ ID-No: 8 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll.
17. Verwendung der Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 1 und SEQ ID-No: 2 als Primer und der Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 5 und/oder SEQ ID-No: 6 als Hybridisierungssonden in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 7.
18. Verwendung der Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 3 und SEQ ID-No: 4 als Primer und der Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 7 und/oder SEQ ID-No: 8 als Hybridisierungssonden in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 7.
19. Kit zur Analyse von Pilzinfektionen mit Azolderivat-resistenten Pilzstämmen, dadurch gekennzeichnet, daß er eine oder mehrere der Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 1 bis 8 aus den Ansprüchen 9 bis 16 enthält.
20. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 8.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/05454

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VANDEN BOSSCHE ET AL.: "Mutation in cytochrome P-450 dependent 14 alpha demethylase results in decreased affinity for azole antifungals" BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, vol. 18, 1990, pages 122-131, XP002055089 see the whole document ---	1-4,7,8, 20
X	T. M. BROWN: "Molecular genetics and evolution of pesticide resistance" 1996 , AMERICAN CHEMICAL SOCIETY , WASHINGTON, US XP002055091 see page 62 - page 71 --- -/--	1-4,7,8, 20

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 February 1998

Date of mailing of the international search report

24/02/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Molina Galan, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.

PCT/EP 97/05454

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>BUCHMAN ET AL.: "Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplification" SURGERY, vol. 108, 1990, pages 338-347, XP002054012 cited in the application see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,20
A	<p>LAI ET AL.: "Nucleotide sequence of P450 L1A1 from C. albicans" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 17, no. 2, 1989, OXFORD GB, page 804 XP002054013 see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	5,6,9-19
A	<p>WO 92 03455 A (ISIS PHARMACEUTICS INC) 5 March 1992 Seq. Id. 11 see page 10</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-3,7,8,20
A	<p>NIESTERS H G M ET AL: "RAPID POLYMERASE CHAIN REACTION-BASED IDENTIFICATION ASSAYS FOR CANDIDA SPECIES" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 31, no. 4, April 1993, pages 904-910, XP000673321 cited in the application</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>US 5 426 026 A (JORDAN JEANNE A) 20 June 1995</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
P,X	<p>T. WHITE: "The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole resistant lanosterol 14 alpha demethylase in C. albicans" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 41, no. 7, July 1997, pages 1488-1494, XP002055090 see the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-8,11,12,15,18-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/05454

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9203455 A	05-03-92	AU 649734 B	02-06-94
		AU 8635591 A	17-03-92
		CA 2089665 A	17-02-92
		EP 0652888 A	17-05-95
		JP 7079704 B	30-08-95
		JP 6501844 T	03-03-94
		US 5691461 A	25-11-97
US 5426026 A	20-06-95	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05454

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	VANDEN BOSSCHE ET AL.: "Mutation in cytochrome P-450 dependent 14 alpha demethylase results in decreased affinity for azole antifungals" BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, Bd. 18, 1990, Seiten 122-131, XP002055089 siehe das ganze Dokument	1-4,7,8, 20
X	T. M. BROWN: "Molecular genetics and evolution of pesticide resistance" 1996, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US XP002055091 siehe Seite 62 - Seite 71 --- -/-	1-4,7,8, 20

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. Februar 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

24/02/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Molina Galan, E

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BUCHMAN ET AL.: "Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplification" SURGERY, Bd. 108, 1990, Seiten 338-347, XP002054012 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,20
A	LAI ET AL.: "Nucleotide sequence of P450 L1A1 from C. albicans" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 17, Nr. 2, 1989, OXFORD GB, Seite 804 XP002054013 siehe das ganze Dokument ---	5,6,9-19
A	WO 92 03455 A (ISIS PHARMACEUTICS INC) 5.März 1992 Seq. Id. 11 siehe Seite 10 ---	1-3,7,8, 20
A	NIESTERS H G M ET AL: "RAPID POLYMERASE CHAIN REACTION-BASED IDENTIFICATION ASSAYS FOR CANDIDA SPECIES" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Bd. 31, Nr. 4, April 1993, Seiten 904-910, XP000673321 in der Anmeldung erwähnt ---	
A	US 5 426 026 A (JORDAN JEANNE A) 20.Juni 1995 ---	
P,X	T. WHITE: "The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole resistant lanosterol 14 alpha demethylase in C. albicans" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Bd. 41, Nr. 7, Juli 1997, Seiten 1488-1494, XP002055090 siehe das ganze Dokument -----	1-8,11, 12,15, 18-20

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. .nales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05454

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9203455 A	05-03-92	AU 649734 B	02-06-94
		AU 8635591 A	17-03-92
		CA 2089665 A	17-02-92
		EP 0652888 A	17-05-95
		JP 7079704 B	30-08-95
		JP 6501844 T	03-03-94
		US 5691461 A	25-11-97
<hr/>			
US 5426026 A	20-06-95	KEINE	
<hr/>			



1

2

3

4